

*Рекомендована д.х.н., професором І.Ф.Макаревичем*

УДК 615.277.3

## ОТРИМАННЯ ЛІПОСОМАЛЬНИХ ФОРМ ЦИТОСТАТИКІВ ЗА ТЕХНОЛОГІЄЮ “ХІМІЧНОГО ГРАДІЕНТА”

А.В.Стадніченко, Ю.М.Краснопольський, Ю.І.Губін, С.М.Коваленко

Національний фармацевтичний університет

**Були отримані рідкі ліпосомальні форми чотирьох антрациклінових антибіотиків: доксорубіцину, епі-рубіцину, ідарубіцину, мітоксанtronу. Отримання ліпосом проводилося за методом хімічного градієнта — градієнта концентрації сульфату амонію і градієнта pH. Заміряно показники інкапсуляції, при цьому показано, що метод з градієнтом pH має кращі показники ступеня включення в порівнянні з методом градієнта сульфату амонію.**

Створення сучасних лікарських засобів для боротьби з онкологічними захворюваннями є актуальним завданням фармації. Ліпосомальні лікарські препарати з антрацикліновими антибіотиками (рис. 1) призначені ефективними засобами при проведенні терапії [1, 5, 8]. Ліпосомальні препарати мають підвищенну ефективність, що виявляється в зниженні токсичності та підвищенні терапевтичного ефекту за рахунок пролонгованої дії при введенні в організм [9].

Наш досвід показує, що створення ліпосомальних засобів з водорозчинною лікарською речовиною за класичною технологією (диспергування ліпідної плівки в буферному розчині з активною субстанцією) часто має недолік — складність відтворення від серії до серії. При виробництві ліпосомальних засобів за цією технологією для забезпечення якості готового продукту доводиться враховувати фізико-хімічні властивості сировини — фосфатидилхоліну, який отримують з курячих яєчних жовтків і який схильний до сезонних коливань жирнокислотного складу. Як наслідок цього, спостерігається певний розкид у температурі фазового переходу в ліпідному шарі, що є найважливішим показником при гомогенізації і включені активної речовини. Це в значній мірі ускладнює процес стандартизації виготовлення ліпосомальних лікарських засобів.

Отримання ліпосом по технології “хімічного градієнта” є ефективним методом, що застосовується в сучасній фармацевтичній промисловості. Досягається можливість інкапсуляції лікарських засобів у ліпосоми до 100% [2, 4]. Метод також дозволяє розширувати діапазон прийнятності си-

ровини для отримання ліпідного шару без втрати якості готової лікарської форми і створювати рідкі лікарські препарати ліпосом із стандартизованим розміром часток. При цьому можна варіювати діаметрами ліпосом на стадії екструзії без побоювання, що на стадії ліофілізації — регідратації відбудеться укрупнення наночасток [3].

Мета роботи полягала у створенні ліпосомальних лікарських форм з антрацикліновими антибіотиками за допомогою двох варіантів методики “хімічного градієнта” — градієнта pH і градієнта концентрації сульфату амонію.

### Експериментальна частина

Об’єктами дослідження були вибрані ліпосомальні форми цитостатичних антибіотиків антрациклінового ряду: 1, 2, 3, 4 (рис. 1). Для отримання ліпосом використовували яєчний фосфатидилхолін. Ліпосоми отримували екструзійним методом.

Будова ліпідного шару дозволяє проникати крізь фосфоліпідну мембрну об’єктам тільки в молекулярній формі, не іонізованим, тим, що не мають поверхневого заряду. Об’єкти, що мають поверхневий заряд, можуть проникати лише в гідрофільну частину мембрани, створену залишками фосфорної кислоти, і не здатні проникати крізь здвоєний шар залишків жирних кислот [6, 7].

У разі створення ліпосом за технологією градієнта pH передбачається наступний механізм накопичення активної речовини усередині ліпосом. При попаданні антрациклінового антибіотика у формі солянокислої солі у фосфатний буфер з pH 6,5-7,5 встановлюється рівновага (рис. 2), в результаті якої частина антибіотика переходить у молекулярну форму. Незаряджена молекула антибіотика проходить крізь мембрну і потрапляє у внутрішню порожнину ліпосоми. В процесі встановлення рівноваги частина молекулярної форми проходить крізь мембрну і залишає зону реакції, при цьому зміщує рівновагу у бік утворення незарядженої форми антибіотика. Потрапляючи у внутрішній об’єм ліпосоми, заповнений цитратним буферним розчином з pH 3,0-4,0, незаряджена молекула антибіотика приєднує протон до первинної 1, 2, 3 або вторинної 4 аміногрупи і набуває таким чином позитивного заряду.

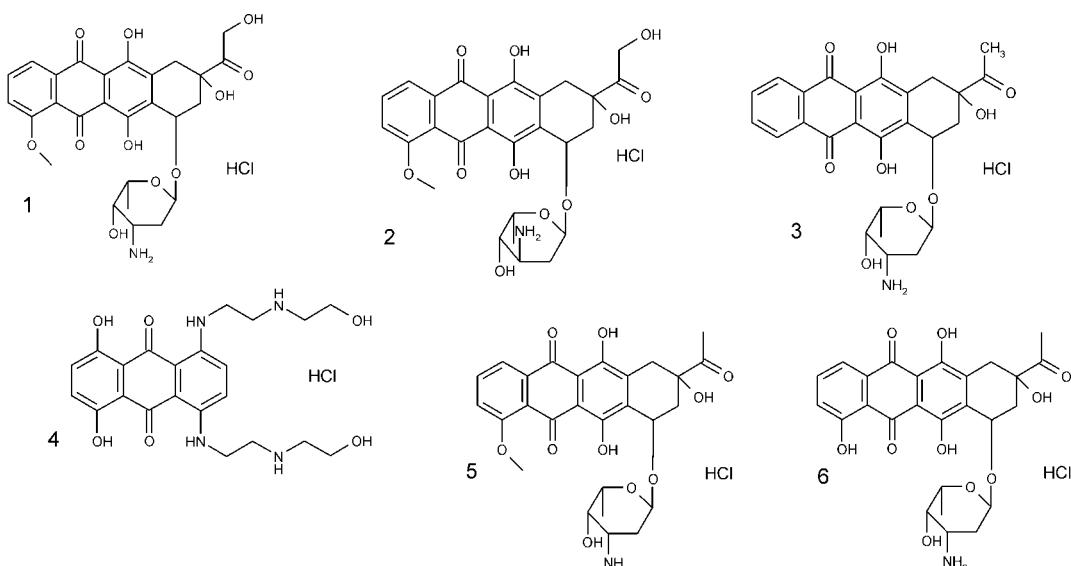


Рис. 1. Антибіотики антраціклінового ряду: 1 — доксорубіцину гідрохлорид; 2 — епірубіцину гідрохлорид; 3 — ідарубіцину гідрохлорид; 4 — мітоксанtronу гідрохлорид; 5 — рубоміцину гідрохлорид; 6 — карміноміцину гідрохлорид.

Заряджена молекула втрачає можливість проникати крізь мембрани, накопичуючись таким чином усередині ліпосоми. При цьому кількість антибіотика, інкапсульована усередині ліпосоми, в значній мірі залежатиме від місткості буферного розчину усередині ліпосоми, а також від величини pH всередині і зовні ліпосоми [7, 10].

У разі створення ліпосом за технологією градієнта концентрації сульфату амонію фосфоліпідну плівку ресуспендують в середовищі концентрованого буферного розчину з сульфатом амонію з pH 5,0-5,6. зовнішній буфер замінюють на ізотонічний розчин хлориду натрію або фосфатний буфер з pH 6,5-7,5. При цьому механізм утворення молекулярної форми антибіотика зовні ліпосоми і її проникнення через фосфоліпідну мембрану був аналогічним вищевикладеному для методу отримання з градієнтом pH (рис. 2). Проте після попадання молекули антибіотика всередину ліпосоми механізм дії наступний: молекула антибіотика, що потрапила всередину ліпосоми, приєднує протон по аміногрупі і набуває позитивного заряду по реакції обміну з іоном амонію. Іон амонію втрачає протон і перетворюється на моле-

кулярний аміак, що проходить крізь мембрани в зовнішній буферний розчин. При цьому значення pH у зовнішньоліпосомальному просторі підвищується на 0,1-0,2 одиниці pH. Кількість антибіотика, здатна проникнути і зв'язатися в ліпосомі, в даному випадку залежатиме, як і в разі градієнта pH, від концентрації (місткості) буферного розчину у внутрішньоліпосомальній порожнині, а також від різниці концентрацій розчину (градієнта) сульфату амонію всередині та зовні ліпосоми [2, 10].

Відомо, що антибіотики антраціклінового ряду найбільш стійкі в розчині у діапазоні pH 2,5-3,5. Більшість рідких форм доксорубіцину, епірубіцину, ідарубіцину і мітоксанtronу мають pH в діапазоні 2,5-3,5. Так само було встановлено, що стабільність антраціклінових антибіотиків на прикладі доксорубіцину підвищується із зростанням їх концентрації в розчині.

При зберіганні у діапазоні температур 2-8°C розчин **1** має тенденцію до гелеутворення, тим сильніше, чим вище його концентрація.

При переході розчину препарату до умов кімнатної температури (18-25°C) гелеподібна струк-

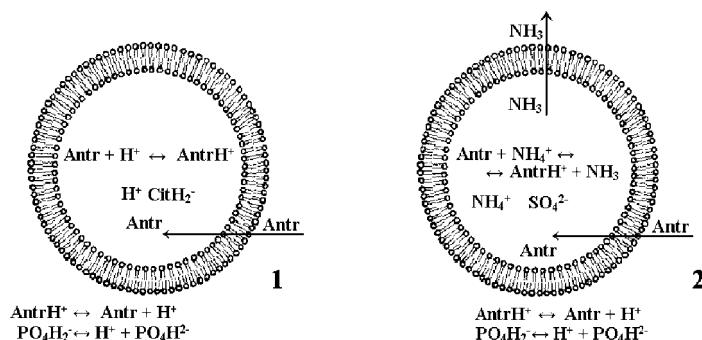


Рис. 2. Інкапсуляція антраціклінових антибіотиків за технологією градієнта pH (1) та градієнта концентрації сульфату амонію (2).  
Примітки: Antr — молекулярна форма антраціклінового антибіотика; AntrH+ — заряджена форма антраціклінового антибіотика (з приєднанням по аміногрупі протоном); CitH2- — лимонна кислота, дисоційована по першому ступеню; NH3 — вільний аміак.

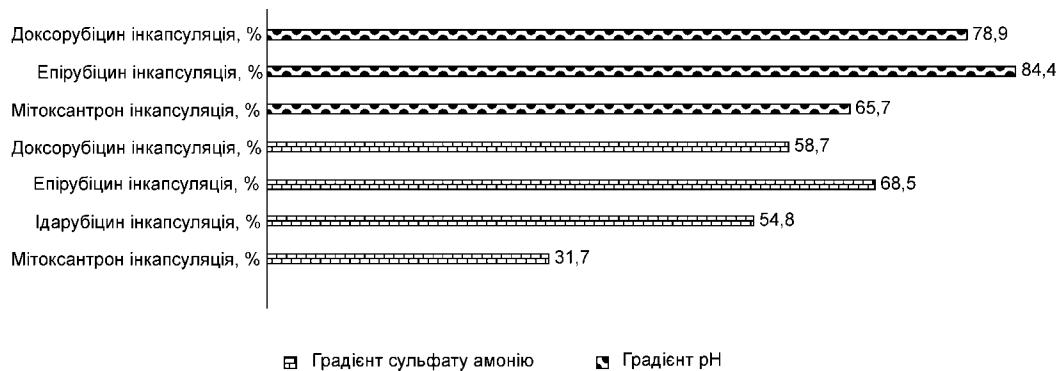


Рис. 3. Ступінь інкапсуляції активних речовин для ліпосомальних форм антрациклінових антибіотиків, отриманих за допомогою методів градієнта pH та градієнта концентрації сульфату амонію через 14 діб.

тура руйнується, і препарат переходить у рідку форму. Також було показано [6], що при додаванні до розчину 1 сульфат іонів 1 перетворюється на гель навіть при кімнатній температурі.

Визначення ступеня інкапсуляції антибіотиків у ліпосоми проводилося відповідно до раніше розробленої нами методики.

#### Результати та їх обговорення

##### *Створення ліпосом за технологією градієнта pH*

Ліпідну плівку отримували методом упарювання етанольного розчину лецитинового масла. У колбу на 250 мл вносили 100 мл 5% розчину лецитинового масла в абсолютному етанолі. Розчин упарювали на роторному випарнику при 25°C і залишковому тиску 20 мм рт. ст. Отриману плівку гідратували у 200 мл буфера на основі цитрату натрію з pH 3,5.

Отримали 200 мл 2,5% розчину мультиламеллярних ліпосом у водному буферному розчині. Далі розчин піддавали екструзії і отримували ліпосоми з розмірами 50–150 нм. Отримання ліпосом вели в декілька циклів, перед останнім циклом у розчин внесли стабілізатор. Далі 200 мл отриманого розчину ліпосом завантажували в установку для ультрафільтрації. Для отриманого розчину ліпосом проводили заміну буфера на основі цитрату амонію на буфер з водного розчину хлориду натрію і двозаміщеного фосфату натрію. Об'єм розчину при цьому склав 200 мл. Від розчину відібрали аліквоти. До відібраних розчинів додали 1, 2, 3, 4. Отримані зразки перемішали до повного розчинення препаратів. Отримані розчини розлили у флакони по 5 мл. Флакони помістили на зберігання при температурі 4–8°C.

Ліпідну плівку отримували методом упарювання етанольного розчину лецитинового масла. У колбу на 500 мл вносили 200 мл 5% розчину лецитинового масла в абсолютному етанолі. Розчин упарювали на роторному випарнику при 25°C і залишковому тиску 20 мм рт. ст. Отриману плівку гідратували за допомогою 400 мл буфера на основі сульфату амонію з pH 5,2. Отримали 400 мл 2,5% розчину мультиламеллярних ліпосом у водному буферному розчині. Далі розчин піддавали екструзії і отримували ліпосоми з розмірами 50–150 нм. Отримання ліпосом вели в декілька циклів, перед останнім циклом у розчин внесли стабілізатор.

Далі 400 мл отриманого розчину ліпосом за- вантажували в установку для ультрафільтрації. Для отриманого розчину ліпосом проводили заміну буфера на основі цитрату амонію на буфер з водного розчину хлориду натрію і двозаміщеного фосфату натрію. Об'єм розчину при цьому склав 200 мл. Від розчину відібрали аліквоти. До відібраних розчинів додали 1, 2, 3, 4. Отримані зразки перемішали до повного розчинення препаратів. Отримані розчини розлили у флакони по 5 мл. Флакони помістили на зберігання при температурі 4–8°C.

Було проведено вимірювання ступеня інкапсуляції на трьох етапах: безпосередньо після приготування ліпосом, через два дні після приготуван-

Таблиця 2

Ступінь інкапсуляції в ліпосомах, виготовлених за методом градієнта концентрації сульфату амонію

Термін вимірювання	Ступінь інкапсуляції			
	доксо-рубіцин	епірубіцин	ідарубіцин	мітоксантрон
Після виготовлення	65,0%	39,3%	43,7%	
Через 2 доби	67,7%	46,9%	64,4%	
Через 14 діб	78,9%	84,4%	65,7%	

Таблиця 1

Ступінь інкапсуляції в ліпосомах, виготовлених за методом градієнта pH

Термін вимірювання	Ступінь інкапсуляції		
	доксорубіцин	епірубіцин	мітоксантрон
Після виготовлення	65,0%	39,3%	43,7%
Через 2 доби	67,7%	46,9%	64,4%
Через 14 діб	78,9%	84,4%	65,7%

ня, через чотирнадцять днів після приготування. Зразки зберігалися при температурі 4–8°C і вилу-чалися з холодильника безпосередньо перед про-веденням вимірювань. Були побудовані калібра-вальні графіки по 1, 2, 3, 4. Для розрахунку бралися величини висот піків. Результати вимірю-вань наведені в табл. 1, 2.

З табл. 1 і 2 видно, що накопичення цитоста-тиків у ліпосомах зростає в процесі зберігання ліпосом при температурі 4–8°C. Це є сприятливим чинником, оскільки у разі видалення невключеної речовини можна не побоюватися процесу “витоку речовини з ліпосом”. У цьому випадку, вивільнена речовина поглинатиметься іншими ліпосомами, підтримуючи таким чином високий ступінь вклю-чення. Основна маса активної речовини потрапляє в ліпосоми протягом двох перших діб.

Раніше нами було проведено експеримент по дослідженням стійкості антрациклінових антибіотиків упродовж часу (приклад 1) при різних значеннях pH та концентрації. Отримані дані показують, що антра-циклінові антибіотики більш стабільні при pH 3,5 (внутрішнє середовище ліпосом за технологією гра-діента pH), ніж при pH 5,2 (внутрішнє середовище ліпосом за технологією градіента сульфату амонію).

З рис. 3 видно, що показник ступеня інкапсу-ляції для кожної з речовин вище для ліпосом, виготовлених за допомогою градієнта pH, у пор-рівнянні з ліпосомами, виготовленими за допомо-гою сульфату амонію.

З табл. 1 і 2, а також з рис. 3 видно, що показ-ники інкапсуляції 4 менші, ніж для інших до-

сліджуваних антрациклінів. Цей факт можна по-яснити, виходячи з хімічної структури 4, що має чотири вторинні аміногрупи, які мають можли-вість брати участь у процесі протонізації молекули після її проникнення через бі-шар всередину ліпо-соми. При цьому витрачання 4 ємкості буферного розчину усередині ліпосоми (що є одним з най-важливіших чинників інкапсуляції) відбуватиметься швидше порівняно з іншими антрациклінами 1, 2, 3, що мають одну первинну аміногрупу.

У процесі зберігання ліпосом, виготовлених за технологією градієнта концентрації сульфату амо-нію, pH зовнішнього розчину підвищився з 6,0 до 6,2, що можливо у зв'язку з дифузією аміаку із середини ліпосом.

Показник pH розчину при застосуванні обох технологій знаходиться в інтервалі pH 6,5–7,5, що є оптимальним для ін'єкційних лікарських засобів.

#### ВИСНОВКИ

1. Отримані рідкі ліпосомальні форми з анти-біотиками антрациклінового ряду: 1, 2, 3, 4 за технологією хімічного градієнта — градієнта pH і градієнта концентрації сульфату амонію.

2. Виміряно динаміку включення антибіотиків у процесі зберігання. Технологія отримання ліпо-сомальних лікарських засобів з градієнтом pH за ступенем інкапсуляції має вищі показники в по-рівнянні з використанням технології з градієнтом сульфату амонію.

3. Приготовані рідкі препарати були стабільни-ми в період спостереження (14 діб) при темпе-ратурі 4–8°C.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Кулік Г.І., Пономарєва О.В., Король В.І., Чехун В.Ф. // Онкология. — 2004. — Т. 6, №3. — С. 207-210.
2. Стадніченко А.В., Краснопольський Ю.М. // Фармаком. — 2007. — №1. — С. 64-69.
3. Стадніченко А.В., Краснопольський Ю.М. // Фармаком. — 2007. — №3. — С. 72-77.
4. Стадніченко А.В., Краснопольський Ю.М., Коваленко С.М. // Фарм. журн. — 2008. — №5. — С. 98-103.
5. Dimopoulos M.A., Pouli A., Zervas K. et al. // Ann. Oncol. — 2003. — №14. — P. 1039-1044.
6. Haran G., Cohen R., Bar K.K., Berenholz Y. // Biochem. et Biophys. Acta. — 1993. — Vol. 1151. — P. 201-215.
7. Harrigan P.R., Wong K.F., Redelmeier T.E. et al. // Biochem. et Biophys. Acta. — 1993. — Vol. 1149. — P. 329-338.
8. Hussein M.A., Wood L., Hsi E. et al. // Cancer. — 2002. — №15. — P. 2160-2168.
9. Sadzuka Y., Kishi K., Hirota S., Sonobe T. // J. of Liposome Res. — 2003. — Vol. 13, №2. — P. 157-172.
10. Torchilin V.P., Weissing V. // Oxford. University press — 2003. — P. 396.

УДК 615.277.3

ПОЛУЧЕНИЕ ЛИПОСОМАЛЬНЫХ ФОРМ ЦИТОСТАТИКОВ ПО ТЕХНОЛОГИИ “ХИМИЧЕСКОГО ГРАДИЕНТА”  
А.В.Стадніченко, Ю.М.Краснопольський, Ю.І.Губін, С.Н.Ко-валенко

Были получены жидкие липосомальные формы четырех антрациклиновых антибиотиков: доксорубицина, эпирубицина, идарубицина, митоксандрона. Получение липосом производилось по методу химического градиента: градиента концентрации сульфата аммония и градиента pH. Измерены показатели инкапсуляции, при этом показано, что метод с градиентом pH обладает лучшими показателями степени включения по сравнению с методом градиента сульфата аммония.

UDC 615.277.3

PREPARATION OF CYTOSTATICS IN LIPOSOMAL FORMS BY “CHEMICAL GRADIENT” TECHNOLOGY  
A.V.Stadnichenko, Yu.M.Krasnopol'skiy, Yu.I.Gubin, S.M.Kovalenko

Liquid liposomal forms of four anthracycline antibiotics: doxorubicin, epirubicin, idarubicin and mitoxantrone have been obtained. Preparation was carried out by the chemical gradient method (ammonium sulphate concentration gradient and pH gradient). Encapsulation has been measured. The “gradient pH” method has been shown to possess better encapsulation degree parameters comparing to the “ammonium sulphate gradient” method.